



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

Bescheinigung

Certificate

Attestation

REC'D 08 DEC 2004

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

WIRD PCT

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

03023953.7

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

R C van Dijk



Anmeldung Nr:
Application no.: 03023953.7
Demande no:

Anmeldetag:
Date of filing: 22.10.03
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

Selecore GmbH
Burckhardtweg 2
37077 Göttingen
ALLEMAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.
If no title is shown please refer to the description.
Si aucun titre n'est indiqué se référer à la description.)

Verfahren zur Identifizierung von Enzymen mit gewünschten Eigenschaften durch
Verankerung der Reaktionsprodukte auf der Oberfläche Enzym-präsentierender
Organismen

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s)
revendiquée(s)
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/
Classification internationale des brevets:

C12Q1/00

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten/Contracting states designated at date of
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL
PT RO SE SI SK TR LI

**Verfahren zur Identifizierung von Enzymen mit gewünschten Eigenschaften
durch Verankerung der Reaktionsprodukte auf der Oberfläche Enzym-
präsentierender Organismen**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung von Enzymen mit einer gesuchten Aktivität durch die zufallsmäßige Erzeugung einer großen Sammlung von Enzymvarianten, die Synthese dieser Varianten in Wirtsorganismen, deren Präsentation auf der Oberfläche der Organismen und die Isolierung von Enzymvarianten mit den gewünschten Eigenschaften durch den Nachweis der kovalenten Deposition des Reaktionsproduktes auf der Oberfläche des Wirtsorganismus.

Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zur Identifizierung von Hydrolasen mit gewünschten Eigenschaften, wobei Hydrolasevarianten auf der Oberfläche von Organismen präsentiert werden, welche mit einem zweiten Enzym, das als Hilfsenzym wirkt, dekoriert werden. Das von der Hydrolase freigesetzte Produkt ist seinerseits Substrat für das Hilfsenzym, welches das Produkt aktiviert, so dass dieses durch Kopplung an funktionelle Gruppen auf der Oberfläche des Wirtsorganismus kovalent fixiert wird. Durch die Fixierung des Produktes wird der Wirtsorganismus, der die gewünschte Enzymaktivität aufweist, markiert und kann dann aus einer großen Sammlung von Organismen, die verschiedene Hydrolasevarianten exprimieren, isoliert werden. Dieses Verfahren eignet sich insbesondere zur Durchmusterung großer Bibliotheken und erlaubt es, in kurzer Zeit mehrere Millionen Enzymvarianten zu testen und damit schneller und zielgerichteter als bisher möglich zu Enzymvarianten mit gewünschten Eigenschaften zu kommen.

Hydrolytische Enzyme und insbesondere Esterasen und Lipasen repräsentieren eine Klasse von Enzymen, die unverzichtbares Hilfsmittel für eine Vielzahl von Anwendungen in der organischen Chemie und Biotechnologie geworden sind. Ihr Potenzial beruht auf ihrer Fähigkeit, nicht nur die Hydrolyse, sondern auch die

Synthese vieler verschiedener Ester zu katalysieren, welche üblicherweise mit hoher Spezifität und Selektivität erfolgt. Lipasen (EC 3.1.1.3) sind Carboxylesterasen, die die Fähigkeit besitzen langkettige Acylglycerylester ($>C_{10}$) zu hydrolysieren, während Esterasen (EC 3.1.1.1) Estersubstrate kürzerkettiger Fettsäuren hydrolysieren ($<C_{10}$).

Hydrolasen, darunter vor allem Lipasen und Esterasen, werden in der Biotechnologie vor allem für die Katalyse stereoselektiver Konversionen einer Vielzahl von Aminen, sowie primären und sekundären Alkoholen eingesetzt (Rogalska et al., Biochem. Soc. Trans. 25 (1997), 161-164; Jaeger et al., FEMS Microbiol. Rev. 15 (1994), 29-63). Jedoch ist nicht für jede gewünschte Umsetzungsreaktion eine entsprechend selektive Hydrolase bekannt. Daher wurden neue Wege beschritten, Hydrolasemutanten aus natürlichen Quellen zu isolieren oder bekannte Hydrolasen so abzuwandeln, dass sie den geforderten Ansprüchen an die Selektivität und Spezifität für den kommerziellen Einsatz genügen.

Selektion, d.h. Zellkultivierung unter Bedingungen, die eine Zellvermehrung nur erlauben, wenn ein bestimmtes Enzym aktiv ist, war viele Jahre das Mittel der Wahl, um Enzyme mit gewünschten Eigenschaften zu isolieren. Das bisher erfolgreichste Verfahren beruht auf der Mutagenese eines Gens *in vitro*, welches für ein gewünschtes Enzym kodiert, der Einführung der mutagenisierten DNA in Zellen, um eine Bibliothek zu generieren, und schließlich der Selektion von Zellen, die ein aktives Enzym produzieren, durch Anlegen restriktiver Wachstumsbedingungen. So konstruierten z.B. Palzkill et al. (J. Bacteriol. 176 (1994), 563-568) Sammlungen großer Bibliotheken, bei denen mehrere Aminosäuren umfassende Sequenzabschnitte in beta-Lactamase durch den Einsatz von *in vitro* Techniken randomisiert wurden. Die beta-Lactamase Mutantengene wurden durch Transformation in *E. coli* eingebracht. Zellen, die in der Lage waren, in Gegenwart von beta-Lactam-Antibiotika zu wachsen, welche normalerweise schlechte Substrate für beta-Lactamase sind, wurden isoliert (Venkatachalam et al., J. Biol. Chem. 269 (1994), 23444-23450).

Ein Vielzahl von Techniken einschließlich chemischer Mutagenese isolierter DNA, Genamplifikation durch "Error prone" PCR und Oligonucleotid-Mutagenese wurden eingesetzt, um Bibliotheken von Mutanten-Genen zu generieren, die eine gewünschte Anzahl von Nukleotidsubstitutionen aufweisen. Häufig werden mehrere Runden von Selektion und Mutagenese angewandt, um zunehmend verbesserte Enzyme zu selektieren.

Die Selektion verbesserter Enzyme, die in vitro konstruierten Gen-Bibliotheken entstammen, ist ein leistungsfähiges Verfahren, um Enzyme mit gewünschten Eigenschaften zu erhalten. Dieses kann allerdings nur dann eingesetzt werden, wenn das gesuchte Enzym eine essentielle und für das Überleben der Zelle notwendige Reaktion katalysiert. Leider ist es für eine Vielzahl kommerziell interessanter enzymkatalysierter Reaktionen nicht möglich, eine Selektionsstrategie zu entwickeln.

Für Enzymreaktionen, bei denen das Design einer Selektionsstrategie nicht möglich ist, müssen Bibliotheken von Mutanten durch Anwendung eines direkten Assays durchgemustert werden. Dabei wird wiederum durch Einführung von Mutationen im Gen des entsprechenden Enzyms eine Sammlung von Enzymgenen erzeugt. Durch individuelles Einbringen dieser Gene, üblicherweise im Kontext eines Expressionsplasmids, in einen mikrobiellen Expressionswirt wird damit eine Population von Mikroorganismen generiert, von denen jeder Klon im Prinzip eine bezüglich der Aminosäuresequenz variierte Enzymvariante synthetisiert. Die einzelnen Klone werden dann separat vermehrt, entweder als Kolonien auf Agarplatten oder in 96-Loch Platten. Die Wirtszellen werden lysiert und damit wird die Enzymvariante freigesetzt. Jedes einzelne Lysat wird nun mit einem vorgegebenen - häufig chromogenen - Substratmolekül inkubiert und die Umsatzreaktion vermessen. Solche Mikroorganismen, die eine Enzymvariante produzieren, welche gewünschte Verbesserungen in Hinblick auf die gesuchten enzymatischen Eigenschaften aufweist, werden anschließend vermehrt. Durch Gewinnung der für die Enzymvariante kodierenden Gensequenz und Bestimmung der Basenabfolge des gegenüber dem Wildtyp veränderten Gens kann die erhaltene Variante bezüglich ihrer Abweichungen von der Basenabfolge des ursprünglich eingesetzten Gens charakterisiert werden. Durch Anwendung dieser Strategie konnten z.B. Moore und Arnold (Nature Biotechnol. 14 (1996), 458-467) eine Variante der p-Nitrobenzylesterase isolieren, welche in 30% DMF eine 16-fach höhere Aktivität aufwies als das Ausgangsenzym.

Üblicherweise zeigt die aus einer einzigen Runde von Mutagenese und Screening erhaltene Enzymvariante zwar leichte Verbesserungen ihrer enzymatischen Eigenschaften in Richtung auf die gewünschte, prägt jedoch die gewünschte Eigenschaft noch nicht vollständig aus. Daher wird meistens ausgehend von dieser erhaltenen Enzymvariante ein neuer Satz von Genvarianten erzeugt, und mit diesen der Prozess von Genexpression in Mikroorganismen, Bestimmung der

enzymatischen Eigenschaften individueller Klone und Identifizierung von in Hinblick auf die gewünschten Eigenschaften verbesserten Varianten erneut durchlaufen, solange bis die gewünschte Eigenschaft erhalten wird.

Dieses Verfahren birgt jedoch einen wesentlichen Nachteilen in sich: Es erfordert eine physikalische Separierung und Kultivierung in räumlich getrennten Kulturgefäßen (z.B. Mikrotiterplatten oder Reagensgläser) der einzelnen mikrobiellen Klone, welche zufallsmäßig veränderte Gene für das Enzym tragen und damit auch unterschiedliche Enzymvarianten produzieren. In jedem einzelnen der getrennten Kulturgefäße muss dann die enzymatische Eigenschaft der von dem jeweiligen mikrobiellen Klon produzierten Enzymvariante gemessen werden. Dieses Verfahren ist in Bezug auf die dadurch notwendige getrennte Handhabung der mikrobiellen Klone und der getrennten Bestimmung der enzymatischen Eigenschaften jedes einzelnen mikrobiellen Klonen sehr aufwändig. Aus Gründen der Logistik und der Kosten kann damit immer nur ein Subsatz der tatsächlich erzeugten Genvarianten durchgemustert werden. Üblicherweise werden mehrere hundert bis mehrere 1000 Klone wie oben beschrieben in Hinblick auf die gesuchte Eigenschaft untersucht. Die Vielfalt der tatsächlich erzeugten Genvarianten ist demgegenüber aber wesentlich höher und kann über 10^9 liegen. Es ist jedoch sehr wünschenswert, möglichst viele Enzymvarianten untersuchen zu können, da sonst das Risiko besteht, dass eine Variante mit besonders günstigen Eigenschaften unentdeckt bleibt, weil sie nicht zum Ensemble der untersuchten Enzymvarianten gehört.

Das Screening von Kolonien unter Anwendung von Platten-Assays unterliegt außer der Tatsache, dass nur eine begrenzte Anzahl von Screening-Reaktionen durchgeführt werden kann, weiteren Einschränkungen: Da die weitaus größte Anzahl von Proteinen von *E. coli* - welches der am besten geeignete Wirtsorganismus für gelenkte Evolution ist - nicht freigesetzt werden, muss das Substrat in der Lage sein, in die Zellen zu diffundieren und es darf nicht toxisch sein. Außerdem zeigen Platten-Assays, auch solche, für die fluoreszierende Moleküle benutzt werden, häufig eine moderate Spezifität.

Es besteht daher die Tendenz Ultra-Hochdurchsatzverfahren zu entwickeln, die (1) in kleinem Reaktionsmasstab arbeiten, (2) eine schnelle Messung der enzymatischen Eigenschaften jedes einzelnen Klonen einer mikrobiellen Population ermöglichen und mit der (3) weit mehr als die mit dem Stand der Technik mögliche Anzahl von Klonen

bearbeitet werden kann. Wünschenswert ist dabei, dass die zur Testung anstehende Enzymvariante vom mikrobiellen Produzenten nicht nur synthetisiert, sondern freigesetzt wird, so dass eine direkte Interaktion mit dem Substrat stattfinden kann und außerdem nahezu beliebige Reaktionsbedingungen -in Hinblick auf Wahl des Lösungsmittels, pH, Ionenkonzentration etc. geschaffen werden können.

Angestrebt wird ferner, das zu untersuchende Enzym außerhalb der produzierenden Zelle in einer Form zur Verfügung zu stellen, dass es mit der Oberfläche der produzierenden Zelle kovalent verknüpft ist. In den vergangenen Jahren wurde eine Reihe von Screening-Verfahren zur Isolierung von Enzymen mit verbesserten Eigenschaften entwickelt, die das Ziel haben, die Beschränkungen von Platten-Assays aufzuheben und die auf der Durchmusterung Oberflächen-exponierter Enzymbibliotheken beruhen. Vielleicht die innovativste Anwendung wurde am Beispiel der Protease OmpT aus *Escherichia coli* beschrieben (Olsen *et al.*, Nat. Biotechnol. 18 (2000), 1071-1074). Dort wurde mit OmpT eine Protease aus *Escherichia coli* eingesetzt, die von sich aus ein Protein der äußeren Membran ist und damit in der äußeren Membran von *E. coli* verankert ist und eine Protease-Domäne auf der Außenseite der bakteriellen Oberfläche exponiert. Es wurde eine zufällige Sammlung von *ompT* Genvarianten erzeugt. Die operativ mit diesen verknüpften *ompT*-Varianten wurden exprimiert und die jeweilige variante enzymatische Proteindomäne auf der Oberfläche der jeweiligen, diese produzierenden Bakterienzelle exponiert. Die Bakterienzellen wurden mit einem synthetischen Peptid inkubiert, welches zwei räumlich benachbarte Fluorophore trägt. Durch hydrolytische Spaltung - hervorgerufen durch eine OmpT-Variante mit der gewünschten Substratspezifität - des Peptides kommt es zur Separierung der Fluorophore und damit zu einer Änderung der Fluoreszenzeigenschaften des Produktes gegenüber dem Substrat, welches dann eine erhöhte grüne Fluoreszenz zeigt. Das freigesetzte Produkt weist eine positive Nettoladung auf, so dass es auf der (negativ geladenen) Oberfläche derjenigen Zelle, die eine Proteolyseaktivität gegenüber dem Substrat aufweist, gebunden bleibt. Damit war es möglich, durch Durchflußzytometrie grün-fluoreszierende Zellen zu isolieren, bei denen die beobachtete grüne Fluoreszenz mit einer katalytischen Aktivität der oberflächenexponierten OmpT-Proteasevariante korrelierte. Ein wesentlicher Nachteil dieses Verfahrens besteht jedoch darin, dass das durch Umsatz mit dem Enzym freigesetzte Reaktionsprodukt lediglich durch ionogene Wechselwirkungen, auf der Oberfläche der das Substrat konvertierenden

Bakterienzelle gebunden ist. Damit ist eine gewünschte permanente Kopplung des Phänotyps der enzymatischen Aktivität mit dem korrespondierenden Genotyp der diese Aktivität ausprägenden Bakterienzelle nicht gegeben. Es besteht stets das

Risiko, dass sich Produktmoleküle von der Oberfläche der sie generierenden Bakterienzelle ablösen, damit in Lösung freigesetzt werden und damit auf der Oberfläche anderer, nicht die gewünschte enzymatische Aktivität ausprägende Bakterien binden. Dadurch wird eine Identifizierung der Bakterien, die die gewünschte Enzymaktivität exprimieren, durch Nachweis der gebundenen Produktmoleküle erheblich erschwert. Außerdem bleibt die Bindung des Produktes an die Zelloberfläche nur unter Niedrigsalzbedingungen erhalten und das Verfahren ist nur dann anwendbar, wenn das erhaltene Produkt eine Ladung aufweist und wenn diese Ladung gegensätzlich zu der Ladung der Oberfläche der Wirtszelle ist. Darüber hinaus ist es nur auf solche Mikroorganismen anwendbar, die eine geladene Oberfläche besitzen. Ferner kann das Verfahren nicht eingesetzt werden, wenn sich die auf dem Substrat- oder Produktmolekül befindliche Ladung in ungünstiger Weise auf die Enzymreaktion auswirkt.

Es besteht daher der Bedarf, Verfahren zur Isolierung von Enzymen, insbesondere von solchen mit Substrat-spaltender Aktivität, mit gewünschten Eigenschaften zur Verfügung zu stellen, die einen extrem hohen Durchsatz erlauben und eine einfache und zuverlässige Bestimmung positiver Klone erlauben.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, derartige Verfahren zur Verfügung zu stellen.

Diese Aufgabe wird gelöst durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung eines Enzymes mit einer gewünschten Substrat-spaltenden Aktivität, wobei eine Bibliothek, die eine Vielzahl verschiedener Kandidatenpolypeptide kodiert, derart von geeigneten Wirtsorganismen exprimiert wird, dass die Kandidatenpolypeptide auf der Oberfläche der Wirtsorganismen präsentiert werden, und die Wirtsorganismen mit dem zu spaltenden Substrat in Kontakt gebracht werden, dadurch gekennzeichnet, dass

- (a) auf der Oberfläche der Wirtsorganismen ein Hilfsenzym bereitgestellt wird, welches die Ausbildung einer kovalenten Bindung ermöglicht zwischen der

Oberfläche des Organismus und einem Produkt, das durch die Substratspaltungs-Reaktion entsteht, die durch ein Kandidatenpolypeptid katalysiert wird, und

- (b) die Wirtsorganismen identifiziert werden, bei denen das Produkt auf der Oberfläche gebunden ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist besonders vorteilhaft, da es die kovalente Bindung eines Produktes der durch das Kandidatenpolypeptid katalysierten Reaktion auf der Oberfläche der Wirtsorganismus ermöglicht. Dadurch wird die Verlässlichkeit, mit der Wirtsorganismen, die die gewünschte Enzymaktivität exprimieren, identifiziert werden können, drastisch erhöht. Die kovalente Fixierung des Reaktionsproduktes an der Oberfläche des Wirtsorganismus erlaubt eine bessere Korrelation zwischen der Detektion der gewünschten Enzymaktivität und dem Wirtsorganismus, der diese Enzymaktivität exprimiert. Die Nachteile der im Stand der Technik beschriebenen Verfahren, bei denen das Reaktionsprodukt über ionische Wechselwirkungen an die Zelloberfläche einer Wirtszelle gebunden wird, werden vermieden. Das erfindungsgemäße Verfahren ist darüber hinaus sehr breit anwendbar, d. h. auf alle möglichen Enzymaktivitäten und Substrate, da keine Rücksicht auf die Ladungsverhältnisse des Substrats bzw. des verwendeten Wirtsorganismus genommen werden müssen.

Der Ausdruck „Enzym“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Polypeptid, das in der Lage ist, eine biochemische Reaktion zu katalysieren.

Das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung kann eingesetzt werden für die Identifizierung von Enzymen mit Substrat-spaltender Aktivität. Der Ausdruck „Substrat-spaltend“ bedeutet dabei, dass das Enzym eine Reaktion katalysiert, durch die ein vorgegebenes Substrat (Edukt) in mindestens zwei Produkte gespalten wird. Reaktionen, die zur Spaltung eines Edukts durch ein Enzym in mindestens zwei Produkte führen sind beispielsweise Hydrolyse, Phosphorolyse oder Eliminierung. Phosphorolyse ist dabei die Spaltung einer Bindung durch Orthophosphat. Hydrolyse bezeichnet eine Reaktion, bei der die Spaltung einer Bindung durch Wasser erfolgt, wobei eine OH-Gruppe in ein Produkt der Spaltungsreaktion und ein Wasserstoffatom in das andere Produkt inkorporiert wird. Eliminierung bezeichnet eine Reaktion bei der zwei Substituenten eines Paares benachbarter Atome in einem

Molekül entfernt werden, ohne dass ein Ersatz durch andere Atome oder Gruppen erfolgt.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens weist daher das Enzym mit Substrat-spaltender Aktivität Hydrolase-Aktivität auf, d. h. es ist in der Lage eine Hydrolysereaktion zu katalysieren. Beispiele für Enzyme mit Hydrolase-Aktivität sind Esterasen, Lipasen, Phosphatasen, Glucosidasen, Acylasen oder Amidasen. Phosphatasen sind Hydrolasen, durch die Phosphosäuremonoester z. B. von Zuckerphosphaten, Nucleosidmonophosphaten oder als terminale Phosphatgruppe von Nukleinsäuren hydrolytisch abgespalten werden. Je nach dem pH-Wert, in dem diese Enzyme ihre optimale Wirksamkeit entfalten, unterscheidet man zwischen sauren Phosphatasen und alkalischen Phosphatasen. Glucosidasen sind Hydrolasen, die glykosidisch gebundene Glukose abspalten. Amidasen katalysieren die hydrolytische Spaltung von Amiden. Acylasen sind Enzyme, welche in der Lage sind, die Abspaltung von Acylgruppen aus einem Molekül zu katalysieren. Dazu gehören z. B. Deacylasen, aber auch Lipasen.

Lipasen (E.C. 3.1.1.3) sind Carboxylesterasen, die die Fähigkeit besitzen, langkettige Fettsäureester ($\geq C_{10}$) zu hydrolysieren. Esterasen (E.C. 3.1.1.1) besitzen dagegen die Fähigkeit, Estersubstrate kürzerkettiger Fettsäuren zu hydrolysieren ($\leq C_{10}$). Hierzu gehören zum Beispiel biotechnologisch wichtige Lipasen und Esterasen, wie Phospholipasen (Lederverarbeitung), Acylasen aus *B. megaterium* und *E. coli* (chemische Synthese), Lipase aus *Aspergillus* sp. (Prostaglandinsynthese), LipA aus *B. subtilis* (Cephalosporinsynthese), Lipase aus *Candida* sp. (Pyrolidinionsynthese), Lipase aus *C. rugosa* (Synthese von Ibuprofen), aus *Chromobacterium* (Vitamin D Synthese), aus *M. miehei* (Synthese von Ketoprofen), aus *P. cepacia* (Rapamycinsynthese), aus *P. fluorescens* (Synthese von Hydantoinen) und aus *Streptomyces* sp. (Synthese von Penicillinen).

Vorzugsweise ist das Enzym mit Esteraseaktivität abgeleitet von einer Esterase aus einem prokaryontischen Organismus, vorzugsweise einem Bakterium, besonders bevorzugt einem Bakterium der Gattung *Pseudomonas* und ganz besonders bevorzugt aus der Species *Pseudomonas aeruginosa*. Insbesondere bevorzugt ist die Esterase abgeleitet von der Esterase EstA aus *Pseudomonas aeruginosa*. Beschrieben ist dieses Enzym beispielsweise in Wilhelm et al. (J. Bacteriol. 181

(1999), 6977-6986). Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der EstA Esterase sind in Figur 4 gezeigt.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist das Enzym mit Lipaseaktivität abgeleitet von der Lipase LipA aus *Bacillus subtilis* (Eggert et al., Eur.J. Biochem. 267 (2000), 6459-6469; Van Pouderoyen et al., J. Mol. Biol. 309 (2001), 215-216; Eggert et al., FEBS Lett. 502 (2001), 89-92; Eggert et al., FEMS Microbiol. Lett. 225 (2003), 319-324).

Das Substrat, das in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt wird und für das ein Enzym mit entsprechender Substrat-spaltender Aktivität gesucht wird, kann im Prinzip jedes beliebige Substrat sein, das durch ein Enzym spaltbar ist. Das Substrat wird in dem erfindungsgemäßen Verfahren so gewählt, dass es durch die gewünschte zu identifizierende Enzymaktivität gespalten wird. Ferner sollte dabei sicher gestellt sein, dass das Substrat lediglich der gewünschten, zu identifizierenden Enzymaktivität als Substrat dient, nicht jedoch dem gleichzeitig auf der Oberfläche des Wirtsorganismus bereitgestellten Hilfsenzym. Vorzugsweise ist es ein Substrat, das durch eine durch ein Enzym katalysierte Reaktion hydrolytisch spaltbar ist, besonders bevorzugt ist das Substrat ein Ester. Wird in dem Verfahren versucht, ein Enzym zu identifizieren, das eine Esterase oder eine Lipase ist, so ist das Substrat vorzugsweise ein Ester kürzerkettiger Fettsäuren ($\leq C_{10}$) oder ein Derivat eines solchen Esters bzw. ein langkettiger Fettsäure ($\geq C_{10}$) oder ein Derivat eines solchen Esters. Beispiele für Derivate sind z. B. halogenierte Fettsäuren, verzweigtkettige Fettsäuren, Aminosäuren oder Hydroxysäuren und viele andere.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens hat das Enzym Esterase- bzw. Lipaseaktivität und das Substrat ist ein Phenolderivat eines Esters beliebiger Carbonsäuren, d. h. ein Phenolester.

Das Substrat weist bevorzugt einen Bestandteil auf, der nach Spaltung durch die gewünschte Enzymaktivität zu einem Produkt führt, das durch das Hilfsenzym in eine aktivierte Form überführt werden kann, die dann mit Gruppen auf der Oberfläche des Wirtsorganismus eine kovalente Bindung eingeht. Solche Bestandteile sind dem Fachmann bekannt, z. B. aus dem US-Patent 5,196,306, und umfassen beispielsweise Tyramin und p-Hydroxyphenylpropionylbiocytin. Im Fall eines Esters kann z. B. die Alkoholkomponente nach Spaltung durch eine Esterase durch das Hilfsenzym in ein Radikal überführt werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens trägt das einzusetzende Substrat einen Bestandteil, der den Nachweis eines Produkts der Substratspaltungsreaktion erlaubt. Beispiele für einen solchen Bestandteil sind in der Molekularbiologie routinemäßig eingesetzte Marker, die einen Nachweis erlauben, wie z. B. Fluoreszenzmarker, Chemilumineszenzmarker, radioaktive Marker, Biotin, Avidin, Streptavidin, Antigene für Antikörper, magnetische Partikel oder ein Enzym, dass zu einem nachweisbaren Farbstoff führt bei Kontakt mit einer chromogenen Substanz. Derartige Marker und ihre Verwendungen sind dem Fachmann bekannt und sind im Zusammenhang mit der Identifizierung neuer gewünschter Enzymaktivitäten auch beschrieben in der US-Patentanmeldung 20030036092. Der Bestandteil, der den Nachweis eines Produktes der Substratspaltungsreaktion erlaubt, befindet sich dabei an dem Substrat an einer Komponente, die nach der Spaltungsreaktion durch das Hilfsenzym kovalent auf der Oberfläche des Wirtsorganismus fixiert wird. Wird beispielsweise ein phenolischer Ester als Substrat eingesetzt und eine Peroxidase als Hilfsenzym, so kann in dem phenolischen Ester die Alkoholfunktion mit einem detektierbaren Signalmolekül (in dem angefügten Beispiel Biotin) verknüpft sein. Das durch Hydrolyse des Esters freigesetzte Tyramid, das das Signalmolekül trägt, wird durch die auf der Oberfläche des Wirtsorganismus fixierte Peroxidase in Gegenwart von H_2O_2 aktiviert. Das Phenolradikal reagiert mit aromatischen Resten auf der Oberfläche des Wirtsorganismus und wird dadurch kovalent fixiert. Die Gegenwart des mit dem Signalmolekül markierten Produktes auf der Oberfläche des Wirtsorganismus kann dann mit dem Fachmann bekannten Detektionsverfahren nachgewiesen werden. Im Fall von Biotin kann der Nachweis z. B. über die Bildung von Biotin/Streptavidin-Konjugaten erfolgen. Das Streptavidin kann beispielsweise mit einem fluoreszierendem Stoff, z. B. R-Phycoerythrin, gekoppelt sein, der den Nachweis von Biotin über die Bildung der Biotin/Streptavidin-Konjugate erlaubt. Zellen, die entsprechende Fluoreszenz-markierte Konjugate auf ihrer Oberfläche aufweisen, können durch Durchflusscytometrie, z. B. durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung, identifiziert und isoliert werden.

Alternativ kann auch das Substrat selber mit einem Fluoreszenzfarbstoff verknüpft werden, so dass das auf der Zelloberfläche durch das Hilfsenzym fixierte Produkt fluoreszenzmarkiert ist. Auch in diesem Fall können die fluoreszenzmarkierten Zellen

durch Durchflusscytometrie, z. B. Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung, identifiziert und isoliert werden.

Erfindungsgemäß wird auf der Oberfläche des Wirtsorganismus, der ein Kandidatenmolekül auf seiner Oberfläche präsentiert, ein „Hilfsenzym“ bereitgestellt. Dieses Hilfsenzym ist in der Lage, eine Reaktion zu katalysieren, welche die kovalenten Bindung eines Produktes der Spaltungsreaktion an der Oberfläche des Wirtsorganismus ermöglicht. Vorzugsweise ist das Hilfsenzym ein Enzym, das in der Lage ist, ein durch die Substratspaltungsreaktion freigesetztes Produkt in eine aktivierte Form zu überführen, die in der Lage ist, mit Gruppen, die auf der Oberfläche des Wirtsorganismus vorhanden sind, eine kovalente Bindung einzugehen. Solche Enzyme sind dem Fachmann bekannt und umfassen vorzugsweise jene, die in dem US-Patent 5,196,306 beschrieben sind, dessen Offenbarungsgehalt hiermit durch Bezugnahme in die vorliegende Anmeldung inkorporiert wird. Beispiele für Hilfsenzyme sind somit Peroxidasen, Ligasen, Oxidoreductasen, Transferasen und Isomerasen. Bevorzugt sind Peroxidasen, Oxidasen, z. B. Aminooxidasen, und Transferasen. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Hilfsenzym um eine Peroxidase. Der Begriff Peroxidase bezeichnet allgemein Enzyme, die die Oxidation einer Verbindung mit Peroxid als Oxidationsmittel katalysieren.

Es kann im Prinzip jede beliebige Peroxidase in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden. Beispiele sind Myeloperoxidase (McCormick et al., J. Biol. Chem. 273 (1998), 32030-32037; Myeloperoxidase aus menschlichen Leukozyten wird vertrieben durch Fluka, Sigma-Aldrich), Lactoperoxidase (Heinecke, Toxicology 177 (2002), 11-22; Ostdal et al., J. Agric. Food Chem. 48 (2000), 3939-3944; Lactoperoxidase aus Kuhmilch wird vertrieben durch Fluka, Sigma-Aldrich), Ribonuclease A bei Zusatz von Nickelionen (Gill et al., Chem. Res. Toxicol. 10 (1997), 302-309) und Peroxidase aus Meerrettich (Horseradish-Peroxidase; HRP). Bevorzugt wird Horseradish Peroxidase (HRP) verwendet. Sie ist kostengünstig zu erhalten (z. B. Sigma, Fluka) und hat sich für eine Vielzahl biochemischer Nachweisreaktionen bewährt.

Wie oben erwähnt, ist das Hilfsenzym vorzugsweise in der Lage, ein durch die Substratspaltungsreaktion freigesetztes Produkt in eine aktivierte Form zu überführen, welche in der Lage ist, eine kovalente Bindung mit Gruppen einzugehen,

die auf der Oberfläche des Wirtsorganismus lokalisiert sind. Solche Gruppen auf dem Wirtsorganismus umfassen insbesondere aromatische Reste, wie z. B. die Seitenketten von Tyrosin-, Tryptophan- oder Histidinresten. Unter einer „aktivierten Form“ wird dabei vorzugsweise ein hochreaktives kurzlebiges Reaktionsprodukt verstanden. Eine aktivierte Form kann z. B. ein Radikal sein. Radikale haben den Vorteil, dass sie sehr schnell durch Wassermoleküle deaktiviert werden, wenn sie nicht sofort mit Molekülen auf der Oberfläche des Wirtsorganismus reagieren. Andere aktivierte Formen sind die in dem US-Patent 5,196,306 beschriebenen. Denkbar ist z. B. auch die Verwendung einer Aminooxidase als Hilfsenzym, wenn das durch die Spaltungsreaktion freigesetzte Produkt eine freie Aminogruppe trägt. Die Aminooxidase setzt dann die freie Aminogruppe um zu einem Aldehyd, welches dann auf der Oberfläche des Organismus mit primären Aminen über eine Schiff-Basen-Bildung reagiert und eine kovalente Bindung ausbilden kann.

In analoger Weise können auch andere Oxidasen als Hilfsenzyme eingesetzt werden, die ein in der Spaltungsreaktion freigesetztes Produkt in ein Aldehyd überführen, z. B. Galactoseoxidase, die freigesetzte Galactose zum entsprechenden Aldehyd umwandelt.

Der Ausdruck „auf der Oberfläche des Wirtsorganismus bereitgestellt“ bedeutet, dass das Hilfsenzym an der Oberfläche des Wirtsorganismus vorhanden ist. Das Hilfsenzym kann dabei gemäß bekannter Methoden auf der Oberfläche bereitgestellt werden. Möglich ist z. B. die irreversible oder die reversible Immobilisierung des Hilfsenzym auf der Oberfläche des Wirtsorganismus. Eine irreversible Immobilisierung kann z. B. erreicht werden durch kovalente Bindung des Hilfsenzym an Gruppen, die auf der Oberfläche des Wirtsorganismus vorhanden sind. So ist es möglich, ein Hilfsenzym, insbesondere Peroxidase, dadurch auf der Oberfläche des Wirtsorganismus zu immobilisieren, dass eine Oxidation der Zuckerseitenketten des Proteins mit Natriumperodat und Schiff-Basereaktion der so erzeugten Zuckeraldehyde mit auf der Oberfläche des Wirtsorganismus vorhandenen primären Aminogruppen durchgeführt wird. Ein solches Verfahren ist z. B. beschrieben in Hermanson (Bioconjugate Techniques (1996); Academic Press, New York). Andere Möglichkeiten zur Erzeugung einer kovalenten Bindung sind dem Fachmann bekannt, z. B. durch den Einsatz von Glutaraldehyd, m-Maleimidobenzoyl-N-Hydroxysuccinimidester, Carbodiimide oder bis-diazotiertes Benzidin. Beschrieben

sind diese und andere Verfahren zur Erzeugung kovalenter Bindungen in „Cross-linking techniques“ (Baumert und Fasold, *Methods Enzymol.* 172 (1989), 584-609).

Möglich ist auch die Bindung des Hilfsenzym an die Oberfläche des Wirtsorganismus in Form eines Konjugates aus Hilfsenzym und Rezeptor, wobei der Rezeptor in der Lage ist ein Molekül zu binden, das auf der Oberfläche des Wirtsorganismus vorkommt. Ein Beispiel für einen solchen Rezeptor ist ein Antikörper, der eine Struktur, z. B. ein Protein, auf der Oberfläche des Wirtsorganismus erkennt. Dies kann z. B. ein Konjugat aus dem Hilfsenzym und einem anti-E. coli Antikörper sein, welcher Lipopolysaccharide auf der Zelloberfläche erkennt. Solche Konjugate sind kommerziell erhältlich, z. B. bei Maine Biotechnology Services Inc.. Eine andere Möglichkeit ist ein Konjugat aus einem zuckerbindenden Lektin und einem Hilfsenzym (siehe z. B. Appukuttan et al., *Biochem. Biophys.* 37 (2000), 77-80). Eine weitere Möglichkeit, das Hilfsenzym auf der Oberfläche des Wirtsorganismus zur Verfügung zu stellen besteht darin, dass es von dem Wirtsorganismus exprimiert wird und zwar derart, dass es auf der Oberfläche des Wirtsorganismus präsentiert wird. Verfahren, mit denen dies erreicht werden kann, sind dem Fachmann bekannt und werden weiter unten im Zusammenhang mit der Expression der Kandidatenpolypeptide ausführlich beschrieben.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, ist das zu identifizierende Enzym eine Esterase, das Hilfsenzym eine Peroxidase und das Substrat ist ein Phenolderivat eines Esters beliebiger Carbonsäuren, d. h. ein Phenolester. Solche Phenolester tragen eine funktionelle Gruppe, die den Nachweis der Deposition des Produktes der Esteraseaktivität auf der Oberfläche des Wirtsorganismus ermöglichen. Dabei wird von der bekannten Tatsache Gebrauch gemacht, dass Derivate von Phenol durch Peroxidase in Gegenwart von H_2O_2 durch Bildung eines phenolischen Radikals aktiviert werden, welches mit elektronenreichen Gruppen anderer Moleküle, wie z. B. Tyrosin oder Tryptophanresten, kovalente Addukte bilden. Diese Eigenschaft wurde beispielsweise ausgenutzt, um Präparate immunhistochemisch zu färben (Van Gijswijk et al., *J. Immunol. Methods.* 189 (1996) 117-127; Bobrow et al., *J. Immunol. Methods* 125 (1989), 279-285 ; US Patente 6,593,100, 5,731,158 und 5,196,306 ; EP1129214). Dabei wird Peroxidase mit einem Rezeptor (z. B. einem Antikörper) konjugiert und diese damit über die Rezeptorbindung selektiv platziert. Nicht gebundenes Konjugat wird abgewaschen. Dann wird ein phenolisches

Substratmolekül zugesetzt, welches mit einem Signalmolekül, z. B. mit Biotin, verknüpft ist. Aufgrund der geringen Lebensdauer des durch Peroxidase aktivierten Substrates reagiert dieses in der Nähe des Ortes seiner Bildung ab und fixiert das Biotin kovalent an unmittelbar benachbarten funktionellen Gruppen (Figur 2). Der Phenolester selber ist kein Substrat für die Peroxidase. Somit kann keine Aktivierung des Phenolesters durch die Peroxidase und Deposition auf der Oberfläche des Wirtsorganismus erfolgen. Nur wenn durch die auf der Oberfläche des Wirtsorganismus präsentete Enzymaktivität die Säurefunktion abgespalten wird und die freie phenolische Komponente vorliegt, ist eine kovalente Bindung der phenolischen Komponente, d. h. eines Reaktionsproduktes der Enzymaktivität, auf der Oberfläche des Wirtsorganismus möglich.

Wie bereits oben beschrieben, kann das Substrat (insbesondere der Teil, der nach der Spaltungsreaktion als Produkt durch das Hilfsenzym auf der Oberfläche des Wirtsorganismus fixiert wird) mit einem Markermolekül versehen sein, das den Nachweis des Produkts auf der Oberfläche erlaubt. So kann der Phenolester beispielsweise mit Biotin gekoppelt sein, in der Art, dass das Biotin am Phenolrest hängt. Die Biotin-gekoppelte auf der Oberfläche des Wirtsorganismus fixierte Phenolkomponente kann dann mit dem Fachmann bekannten Nachweisverfahren für Biotin detektiert werden. Möglich ist auch, an den Phenolrest des Phenolesters einen Fluoreszenzfarbstoff zu koppeln, der dann den direkten Nachweis erlaubt bzw. die Isolierung von Wirtsorganismen, auf deren Oberfläche die fluoreszenzmarkierte Phenylkomponente fixiert ist. Im Fall von Zellen kommt hier die Durchflusszytometrie, z. B. Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung, in Frage. Werden als Wirtsorganismen Phagen eingesetzt, kann deren Nachweis, bzw. Anreicherung und Isolierung, z. B. durch die Adsorption an mit einem entsprechenden Rezeptormolekül beschichteten Oberflächen erreicht. Als Oberflächen kommen hier beispielsweise Plastikoberflächen (z. B. Mikrotiterplatten) oder magnetische Partikel in Betracht. Eine gängige Methode ist der Nachweis über Biotin oder Digoxigenin, wobei die starke Bindung von Biotin an Streptavidin bzw. von Digoxigenin an einen Digoxigenin-Antikörper ausgenutzt wird.

Wird in dem erfindungsgemäßen Verfahren als Hilfsenzym eine Peroxidase eingesetzt, so enthält das Medium, in dem die Wirtsorganismen zur Zeit des Inkontaktbringens mit dem Substrat vorliegen, H_2O_2 , das für die enzymatische

Reaktion der Peroxidase notwendig ist. Die Konzentration an H_2O_2 wird dabei so eingestellt, dass sie für die Wirtsorganismen nicht toxisch ist. Geeignete Konzentrationen liegen vorzugsweise im Bereich von 0,00005% (v/v) bis 0,005% (v/v), bevorzugt im Bereich von 0,000075% (v/v) bis 0,004% (v/v), besonders bevorzugt im Bereich von 0,00009% (v/v) bis 0,003% (v/v). Ganz besonders bevorzugt liegt die Konzentration im Bereich von 0,0001% (v/v) bis 0,001% (v/v).

Beschriebene Verfahren zur H_2O_2 vermittelten kovalenten Deposition von phenolischen Komponenten wurde bisher nur zur immunhistochemischen Färbung von fixiertem Zellmaterial, jedoch nicht mit lebenden Zellen oder anderen Organismen eingesetzt, da H_2O_2 ein starkes Zellgift ist und es zu erwarten war, dass die für eine Peroxidase-Reaktion eingesetzte H_2O_2 -Konzentration mit dem Überleben der Zellen nicht vereinbaren ist. Überraschenderweise wurde gefunden, dass die Konzentration an H_2O_2 so weit eingestellt werden kann, dass sie zum einem nicht zum Zelltod führt, zum anderen aber noch eine effiziente Deposition des phenolischen Alkohols auf der Zelloberfläche zulässt. Es wurde gezeigt, dass dieses Verfahren erfolgreich angewendet werden kann, um durch die simultane Zelloberflächenexposition von Enzym (Esterase) und Hilfsenzym (Peroxidase) und den Einsatz von Phenolestern als Substrate, lebende Zellen mit der gewünschten Esteraseaktivität selektiv zu markieren und durch iterative Runden von Isolierung markierter Zellen, Vermehrung der isolierten markierten Zellen und erneute Markierung und Isolierung, Zellen mit der gewünschten Enzymaktivität aus einer Population von Zellen ohne Enzymaktivität zu isolieren.

Bei den in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Wirtsorganismen kann es sich um jede Art von Wirtsorganismen handeln, die für die Präsentation der Kandidatenpolypeptide auf ihrer Oberfläche geeignet sind. Als Wirtsorganismus kommt im Prinzip jeder Organismus in Frage, der in der Lage ist, genetische Information zu tragen, sie zu exprimieren und sich zu replizieren. So umfasst der Begriff „Organismus“ jede Art von Zellen, aber auch Viren und Phagen. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Wirtsorganismen Zellen oder Phagen.

Wenn die Wirtsorganismen Zellen sind, so kann es sich um eukaryontische oder um prokaryontische Zellen handeln. Vorzugsweise sind die Wirtszellen prokaryontische Organismen, besonders bevorzugt Bakterien. Hierbei bevorzugt sind gram-negative Bakterien und unter diesen sind besonders bevorzugt Wirtszellen der Art *E. coli*.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren werden Wirtsorganismen eingesetzt, die die Kandidatenpolypeptide derart exprimieren, dass sie von den Wirtsorganismen auf deren Oberfläche präsentiert werden. Dem Fachmann ist eine Vielzahl von Verfahren bekannt, eine Oberflächenexposition eines Proteins auf einem Wirtsorganismus zu erreichen. Derartige Verfahren sind z. B. bekannt unter den Begriffen „Phage display“ und „Microbial display“. Die Exposition auf der Oberfläche beruht zumeist darauf, dass durch Anwendung geeigneter gentechnischer Methoden eine Enzymvariante auf der Oberfläche des Wirtsorganismus in kovalenter Verknüpfung mit einer Komponente der Oberfläche bereitgestellt wird. Bei Verwendung von Bakterien als Wirtsorganismen wird dies z.B. dadurch erreicht, dass das Gen, welches für das Enzym kodiert, das in Hinblick auf seine Eigenschaften optimiert werden soll, operativ mit der kodierenden Sequenz für ein Protein der äußeren Membran eines mikrobiellen Produzenten verknüpft ist, so dass ein Fusionsprotein gebildet wird, welches in der äußeren Membran des Bakteriums verankert ist und die verknüpfte Proteindomäne auf der Außenseite der äußeren Membran exponiert. Als Membranverankerungsdomäne wurde unter anderem ein Fragment des *E. coli* OmpA Proteins (Francisco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 10444-10448), ein *Escherichia coli* Adhäsion (Maurer *et al.*, J. Bacteriol. 179 (1997), 794-804) oder das Intimin aus enteropathogenen *E. coli* (Wentzel *et al.*, J. Bacteriol. 183 (2001), 7273-7284) eingesetzt. Verfahren zur Präsentation von Proteinen auf der Oberfläche von *E. coli* durch die Präsentation als Fusionsproteine mit Porinen der äußeren Membran von *E. coli* wurden insbesondere beschrieben in Lang (Int. J. Med. Microbiol. 290 (2000), 579-585), Francisco *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 2713-2717) und Wentzel *et al.* (J. Biol. Chem. 274 (1999), 21037-21043). Die Präsentation als Fusionsprotein mit einem zellulären Appendix (Fimbrium) wurde z. B. beschrieben in Westerlund-Wikstrom *et al.* (Protein Eng. 10 (1997), 1319-1326), Westerlund-Wikstrom (Int. J. Med. Microbiol. 290 (2000), 223-230), Kjaergaard *et al.* (Appl. Environ. Microbiol. 67 (2001), 5467-5473) und Schembri *et al.* (FEMS Microbiol. Lett. 170 (1999), 363-371). Die Präsentation als Fusionsprotein mit einem Autotransportprotein der äußeren Membran ist z. B. beschrieben in Klauser *et al.* (EMBO J. 11 (1992), 2327-2335) und Maurer (J. Bacteriol. 179 (1997), 794-804). Beschrieben wurden bereits auch Verfahren zur Präsentation von Polypeptiden auf der Oberfläche anderer Mikroorganismen als *E. coli*. So beschreiben z. B. Jung *et al.* (Nat. Biotechnol. 16 (1998), 576-580) und Kim *et al.* (Appl. Environ. Microbiol. 66

(2000), 788-793) die Zelloberflächenpräsentation von Polypeptiden auf der Oberfläche von *Pseudomonas syringae* durch Fusion an das Eisnucleationsprotein. Ebenso wurden bereits Verfahren zur Oberflächenpräsentation von Polypeptiden in *Bacillus subtilis* (Hansson et al., Comb. Chem. High Throughput Screen. 4 (2001), 171-184) und in *Staphylococcus* (Lehtio et al., FEMS Microbiol. Lett. 195 (2001), 197-204) beschrieben. Auch Verfahren zur Oberflächenpräsentation von Polypeptiden auf eukaryontischen Zellen sind bereits bekannt, z. B. für *Saccharomyces cerevisia* (Boder und Wittrup, Nat. Biotechnol. 15 (1997), 553-557; Boder und Wittrup, Methods Enzymol. 328 (2000), 430-444).

Bevorzugte Verfahren zur Expression von Kandidatenpolypeptiden, die zur Präsentation der Polypeptide auf der Oberfläche von Zellen führen, sind dem Fachmann insbesondere bekannt aus der US-Patentanmeldung 20030036092 und aus Olsen et al. (Nature Biotechnology 18 (2000), 1071-1074).

Auch die Präsentation von Polypeptiden auf der Oberfläche von Phagen, das sogenannte Phagedisplay, ist bereits ausführlich beschrieben und wird vielfach angewandt (siehe z. B. Miyakubo et al. (Nucleic Acids Symp. Ser. 44 (2000), 165-166), Widersten et al. (Meth. Enzymol. 328 (2000), 389-404), Widersten und Mannervik (J. Mol. Biol. 250 (1995), 115-122), Korn et al. (Biol. Chem. 381 (2000), 179-181) und Droge et al. (J. Biotechnol. 101 (2003), 19-28)).

Das erfindungsgemäße Verfahren dient der Identifizierung von Enzymen mit einer gewünschten Substrat-spaltenden Aktivität. Es baut Verfahren auf, die im Stand der Technik bekannt sind, in denen Enzyme mit gewünschten Aktivitäten dadurch identifiziert werden, dass in Wirtsorganismen eine große Anzahl verschiedener Kandidatenpolypeptide exprimiert werden und die Wirtsorganismen ermittelt werden, die die gewünschte Enzymaktivität exprimieren. Die Herstellung von solchen Wirtsorganismen erfolgt in der Regel durch die Bereitstellung von DNA-Bibliotheken, die für eine Vielzahl von Polypeptiden codieren und die Einbringung in entsprechende Wirtsorganismen. Die DNA-Bibliotheken können, z. B. hergestellt werden durch die in-vitro Mutagenese eines Ausgangsgens, welches für ein bestimmtes Enzym codiert. Durch die Mutagenese werden Varianten des Enzyms erzeugt, die dann nach Expression in den Wirtsorganismen auf ihre enzymatischen Eigenschaften hin getestet bzw. selektioniert werden können. Geeignete Methoden zur in-vitro Mutagenese und zur Herstellung geeigneter Wirtsorganismen sind dem

Fachmann bekannt und sind z. B. ausführlich beschrieben in der US-Patentanmeldung US 20030036092. Sie umfassen z. B. die chemische Mutagenese, insbesondere von isolierter DNA, Genamplifikation durch „Error prone“ PCR und Oligonukleotid-Mutagenese. Weitere Möglichkeiten sind die Ligation von randomisierten Genabschnitten (Kassettenmutagenese), Gene Shuffling, in vivo Mutagenese mit mutagenen Agenzien und die Verwendung von E. coli-Mutatorstämmen. Erfindungsgemäß wird somit in den Wirtsorganismen eine Bibliothek exprimiert, wobei diese Bibliothek eine Vielzahl von Kandidatenpolypeptiden kodiert.

Die Identifizierung der Wirtsorganismen in Schritt (b) des Verfahrens kann nach dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen wie sie z. B. beschrieben sind in der US-Patentanmeldung 20030036092. Falls das durch die Substratspaltungsreaktion hergestellte Produkt von sich aus ein Produkt ist, dass einem direkten oder indirekten Nachweis zugänglich ist, so ist die Verwendung eines Markermoleküls nicht unbedingt notwendig. Wie oben erläutert, wird in dem erfindungsgemäßen Verfahren jedoch vorzugsweise ein Substrat verwendet, das mit einem Markermolekül gekoppelt ist, das einen Nachweis des auf der Oberfläche des Wirtsorganismus gebundenen Produkts erlaubt. Beispiele für solche Marker sind oben genannt und umfassen Biotin oder Fluoreszenzfarbstoffe.

Neben der Identifizierung der Produkt-tragenden Wirtsorganismen können derartige Marker auch die Isolierung dieser Organismen erlauben. Bevorzugt wird die Isolierung ausgeführt wie in der US-Patentanmeldung 20030036092 beschrieben. Im Fall von Fluoreszenzfarbstoffen, die direkt an das Produkt gekoppelt sind, können Zellen, die ein derart markiertes Produkt auf ihrer Oberfläche tragen durch Durchflusscytometrie, z. B. Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung, isoliert werden. Dasselbe Verfahren kann angewendet werden, wenn der an das Produkt gekoppelte Marker mit einem anderen Stoff konjugiert wird, der selber fluoresziert oder mit einem Fluoreszenzmarker gekoppelt ist. Ein Beispiel hierfür ist die Möglichkeit, Biotin als Marker an dem Produkt zu haben und das Biotin nachzuweisen durch Streptavidin, an das ein Fluoreszenzmarker gekoppelt ist. Im Fall der Verwendung von Phagen kommt z. B. eine Isolierung über Oberflächen in Frage, die einen Rezeptor für das verwendete Markermolekül tragen, wie bereits oben beschrieben wurde.

Eine andere Möglichkeit zur Isolierung der Wirtsorganismen, die (markiertes) Produkt an ihrer Oberfläche gebunden haben, ist die magnetische (Zell-)Sortierung. Hierfür

werden die Wirtsorganismen mit magnetischen Partikeln in Berührung gebracht, die auf ihrer Oberfläche ein Molekül tragen, das das auf der Oberfläche des Wirtsorganismus fixierte Produkt bzw. den an dieses gekoppelten Marker bindet. So können z. B. solche magnetische Partikel auf ihrer Oberfläche ein Biotin-bindendes Molekül tragen (z. B. Streptavidin) und würden dann Organismen binden, die auf ihrer Oberfläche ein mit Biotin gekoppeltes Produkt tragen.

Es besteht die Möglichkeit, nach einer ersten (Zell-)Sortierung die isolierten Zellen/Organismen zu vermehren, erneut mit Substrat in Berührung zu bringen und erneut einer (Zell-)Sortierung zu unterziehen. Diese Vorgänge können mehrmals wiederholt werden, um eine Anreicherung der gewünschten Zellen/Organismen zu erhalten.

Das erfindungsgemäße Verfahren führt im Schritt (b) zur Identifizierung von Wirtsorganismen, bei denen das Produkt der Substrat-spaltenden Aktivität auf der Oberfläche fixiert ist und die daher voraussichtlich die gewünschte Enzymaktivität exprimieren. Ausgehend von derart identifizierten Organismen kann das erfindungsgemäße Verfahren wiederholt angewendet werden.

Dazu wird die in den identifizierten Wirtsorganismen enthaltene DNA-Sequenz, die die Enzymaktivität kodiert, als Ausgangspunkt für die Erzeugung einer neuen Bibliothek verwendet, die eine Vielzahl von Kandidatenpolypeptiden kodiert. Dies kann durch dem Fachmann bekannte Mutageneseverfahren erfolgen, wie sie schon oben genannt wurden. Wirtsorganismen, die diese Bibliothek exprimieren werden dann wiederum in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Wirtsorganismen, die ein Kandidatenpolypeptid (Enzym) derart exprimieren, dass es auf der Oberfläche des Wirtsorganismus präsentiert wird, und die gleichzeitig auf ihrer Oberfläche ein Hilfsenzym tragen, welches in der Lage ist, eine Reaktion zu katalysieren, die die Ausbildung einer kovalenten Bindung ermöglicht zwischen der Oberfläche des Wirtsorganismus und einem Produkt einer Substratspaltungsreaktion, die von dem Kandidatenpolypeptid katalysiert wird. Für die bevorzugten Ausführungsformen der Wirtsorganismen, Kandidatenpolypeptide (Enzyme), Hilfsenzyme etc. gilt dasselbe, was oben bereits in Zusammenhang mit dem erfindungsgemäßen Verfahren gesagt wurde.

Der Offenbarungsgehalt der im Zusammenhang mit der Beschreibung der Erfindung genannten Dokumente wird hiermit durch Bezugnahme in die vorliegende Anmeldung inkorporiert.

Die folgenden Beispiele dienen der Erläuterung und Illustrierung der Erfindung. Die Erfindung ist jedoch nicht auf die in den Beispielen gezeigten Ausführungsformen beschränkt, sondern betrifft alle oben erläuterten möglichen Ausführungsformen.

Figur 1: Schematische Darstellung des erfindungsgemäßen Verfahrens am Beispiel der Isolierung von Zellen mit Esteraseaktivität durch kovalente Deposition des Hydrolyseprodukts auf der Zelloberfläche. Im Uhrzeigersinn: Verwendung einer Bibliothek von *E. coli* Zellen, welche zufallsmäßig variierte Esterasegene tragen. Nach Induktion der Genexpression wird die Esterase auf der Zelloberfläche präsentiert. Es wird dann das Hilfsenzym Peroxidase auf der Oberfläche der Bakterien fixiert. Nicht gebundenes Enzym wird durch Zentrifugation der Bakterien und Verwerfen des Überstandes entfernt. Dann wird ein Ester-Substrat zugegeben, welches ein phenolischer Ester ist, bei dem die Alkoholfunktion mit einem detektierbaren Signalmolekül (hier Biotin) verknüpft ist. Das durch Hydrolyse des Esters freigesetzte Biotintyramid (in Figur 1 mit einem Dreieck schematisch bezeichnet) wird durch die Zelloberflächen-fixierte Peroxidase in Gegenwart von H_2O_2 aktiviert. Das Phenolradikal reagiert mit aromatischen Resten auf der Zelloberfläche und wird dadurch kovalent fixiert. Nicht abreagierte Substratmoleküle werden durch Zentrifugation und Waschen der Zellen entfernt. Das oberflächenfixierte Signalmolekül kann direkt nachgewiesen werden, wenn es ein Fluoreszenzfarbstoff ist oder indirekt nachgewiesen werden, wie hier am Beispiel der Deposition von Biotin und dessen Nachweis durch Streptavidin, R-Phycoerythrin Konjugat gezeigt. Damit erfolgt eine Kopplung der Esteraseaktivität der Zelle mit einem detektierbaren Zelloberflächensignal, welches die Isolierung einer Esterase-aktiven Zelle aus einer Population von Zellen, z.B. durch Anwendung von Durchflußzytometrie oder magnetischer Zellsortierung ermöglicht.

Figur 2: TSA-Reaktion (Tyramid Signal Amplifikation). Peroxidase-vermittelte kovalente Kopplung von Biotin-Tyramid mit einem Tyrosylrest eines Proteins. Ein Biotinmolekül, welches mit einem Phenol-Derivat verknüpft ist, wird durch Peroxidase in Gegenwart von H_2O_2 durch Bildung eines Phenylradikals aktiviert. Dieses Radikal reagiert, da es sehr kurzlebig ist, in der Nähe seines Entstehungsortes mit

aromatischen Resten ab. Damit wird eine kovalente Fixierung des dektierbaren Signals – hier Biotin – erreicht.

Figur 3: Struktur von LC-LC-Biotin-Tyramid Octansäureester. Dieser Ester kann als Substratmolekül für eine Esterase eingesetzt werden. Das freigesetzte Biotin-tyramid kann dann durch Peroxidase in Gegenwart von H_2O_2 aktiviert werden.

Figur 4: Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des Esterase Gens *estA* aus *Pseudomonas aeruginosa* (aus Wilhelm et al., *J. Bacteriol.* 181 (1999), 6977-6986) . Die kodierende Aminosäuresequenz beginnt bei Base 306. Die putative Signalsequenz ist durch einen Pfeil hervorgehoben.

Figur 5: Zelloberflächenpräsentation von EstA. Zum Nachweis der Zelloberflächen-exposition von EstA wurden induzierte *E. coli* Zellen, die das *estA* Gen unter *lac*-Promotorkontrolle exprimieren, mit anti-EstA Antikörper inkubiert und mit einem biotinylierten zweiten Antikörper und Streptavidin, Phycoerythrin-Konjugat angefärbt. Die Immunfluoreszenz der Zellen wurde in einem Zeiss Axioskop (Filter 15) analysiert. Links: Fluoreszenz; rechts: Durchlichtaufnahme.

Figur 6: Esterase-vermittelte Deposition von Biotin auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen. Induzierte *E. coli* Zellen, die auf ihrer Oberfläche sowohl Peroxidase, als auch EstA tragen (*E. coli* pBBX+) und gleich behandelte Kontrollzellen, die kein *estA*-Gen enthalten (pBBR1MCS), wurden mit dem Substrat Octansäure-Biotin-LC-LC-Tyramidester (Figur 3) in Gegenwart von 0,001 % H_2O_2 inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen des gleichen *E. coli* Stammes, die kein *estA*-Gen tragen. Die Zellen wurden nach 15-minütiger Inkubation in PBS-Puffer gewaschen und mit Streptavidin, Phycoerythrin-Konjugat angefärbt. Die Immunfluoreszenz der Zellen wurde in einem Zeiss Axioskop (Filter 15) analysiert. Links: Fluoreszenzmikroskopie; rechts: Durchlichtmikroskopie.

Figur 7: Isolierung von *E. coli* Zellen mit Esterase-Aktivität aus einer Mischung mit EstA-negativen Zellen

Zur Überprüfung der Anreicherung durch magnetische Sortierung von Zellen, welche EstA-Aktivität zeigen, wurden induzierte Zellen jeder Selektionsrunde auf ihre Esteraseaktivität hin überprüft. Als hydrolysierbares Standardsubstrat diente p-Nitrophenylcaprylat. Während das Ausgangsgemisch keine Esteraseaktivität zeigt, ist nach der ersten Selektionsrunde bereits eine leicht erhöhte Substrathydrolyse zu

erkennen. Diese ist nach der zweiten Selektionsrunde bereits fast auf dem Niveau einer entsprechenden Probe induzierter pBBX+ Transformanten von *E. coli* JM109.

Beispiel 1:

Herstellung von *E. coli* Zellen, die Esterase auf ihrer Zelloberfläche präsentieren

Als Beispiel wurde die Esterase EstA aus *Pseudomonas aeruginosa* eingesetzt (Wilhelm et al., *J. Bacteriol.* 181 (1999), 6977-6986). EstA ist eine Esterase aus *Pseudomonas aeruginosa*, welche aus einer aminoterminalen Zelloberflächen-exponierten Enzymdomäne und einer Membranankerdomäne besteht, welche in der äußeren Membran lokalisiert ist und eine Translokation der aminoterminalen Domäne durch die äußere Membran vermittelt. Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von EstA ist in Figur 4 gezeigt.

Die codierende Sequenz von EstA (Figur 4) wurde in den Vektor pBBX+ (Wilhelm et al., loc. cit.) eingeführt und dadurch unter Kontrolle des *lac* Promotors gebracht. Nach Transformation des *E. coli* Stammes JM109 (Stratagene) wurden *E. coli* Zellen erhalten, die in der Lage waren, das Esterasesubstrat Octansäure-p-Nitrophenylester zu hydrolysieren (Wilhelm et al., loc. cit.). Die Zelloberflächenpräsentation von EstA wurde durch Immunfluoreszenzfärbung der Zellen durch successive Inkubation mit anti-EstA Antikörper (aus Kaninchen), einem biotinylierten anti-Kaninchen-Antikörper und Streptavidin, Phycoerythrin Konjugat nachgewiesen. So behandelte Zellen zeigten bei Analyse im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioskop, Filter 15) eine rote Fluoreszenz (Figur 5).

Beispiel 2:

Kopplung von Horseradish Peroxidase (HRP) auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen

10 µl Natriumperiodatlösung (0,088 M) wurden zu 100 µl Horseradish Peroxidase (10 mg/ml) gegeben. Der Ansatz wurde 1h bei Raumtemperatur im Dunkeln geschüttelt. Dann wurde das Enzym durch Gelfiltration über eine Sephadex G25 Säule vom Überschuß an Natriumperiodat abgetrennt, in 2ml PBS Puffer verdünnt und bei -20°C gelagert.

Beispiel 3:

Synthese des EstA-Substrates LC-LC-Biotin-Tyramid Octansäureester

Das EstA Substrat (Figur 3) wurde aus LC-LC-Biotin-Tyramid durch Umsetzung von 0,2 mg (1,17 μ mol) Octanoylchlorid mit 0,34 mg (0,57 μ mol) LC-LC-Biotin-Tyramid (Pierce) in 0,2 ml Pyridin hergestellt. Nach 60-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Reaktionsansatz lyophilisiert und in 0,1 ml Dimethylformamid aufgenommen.

Beispiel 4:

Esterase-vermittelte Deposition von Biotin auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen

E. coli JM109 Zellen, welche das Plasmid pBBX+ trugen, wurde bei einer optischen Dichte von 0,4 mit IPTG (Endkonzentration 1mM) zur Induktion der Expression des *estA* Gens versetzt und 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurden *E. coli* JM109 Zellen verwendet, die kein *estA*-Gen enthalten. 500 μ l der Kulturen beider Zelltypen wurden abzentrifugiert, mit oxidiertem Peroxidase gekoppelt, anschließend dreimal mit je 500 μ l PBS gewaschen und in 500 μ l 100 mM Kaliumphosphatpuffer, welcher 0,0029 μ mol Biotin-LC-LC-Tyramid-Octansäureester sowie 0,001 % H_2O_2 enthielt für 15 min inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 10 μ l PBS, welches 1 μ l Streptavidin, -R-Phycoerythrin Konjugat (Molecular Probes) enthielt resuspendiert. Nach 5 minütiger Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in 500 μ l PBS-Puffer gewaschen. Dann wurde ein Aliquot im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioskop, Filter 15) analysiert. Eine Deposition von Biotin-Tyramid war nur bei den Zellen mit EstA-Aktivität nachzuweisen (Figur 6).

Beispiel 5:

Isolierung von Zellen mit Esterase-Aktivität aus einer 1:10⁶ Mischung mit Esterase-negativen Zellen

Um zu überprüfen, ob es möglich ist Zellen mit Esterase-Aktivität aus einer Sammlung von Zellen ohne Esterase-Aktivität zu isolieren, wurden mit IPTG induzierte *E. coli* JM109 Zellen, die das Plasmid pBBR1MCS enthalten, welches kein *estA*-Gen umfasst, und JM109 Zellen, welche das Plasmid pBBX+ enthalten, welches ein *estA*-Gen enthält, im Verhältnis 10⁶:1 gemischt. Das 1:10⁶-Gemisch wurde anschließend wie oben beschrieben mit dem Biotin-LC-LC-Tyramid-Octansäureester markiert. Eingesetzt wurden erneut 0,0029 μ mol Substrat in 500 μ l Kaliumphosphatpuffer. Die Inkubationszeit betrug wiederum 15 min. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert und dreimal mit 500 μ l PBS-Puffer gewaschen. Dann wurde

zu 200 µl der Zellsuspension 20 µl Streptavidin-beschichtete paramagnetischen Beads (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) gegeben. Nach 15 minütiger Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und dreimal mit je 500 µl PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 500 µl PBS resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend durch eine mit Eisenkugeln gefüllte und in ein starkes Magnetfeld eingebrachte Säule (MidiMacs, Miltenyi Biotech Bergisch Gladbach) passagiert. Die Säule wurde dreimal mit je 2 ml PBS-Puffer gewaschen. In der Säule zurückgehaltene Zellen wurde nach Entfernen aus dem Magnetfeld mit 2 ml PBS-Puffer eluiert. Die Zellen wurden auf Selektivplatten plattiert und über Nacht vermehrt. Am nächsten Tag wurden die Zellen abgeschwämmt und der Prozess wiederholt.

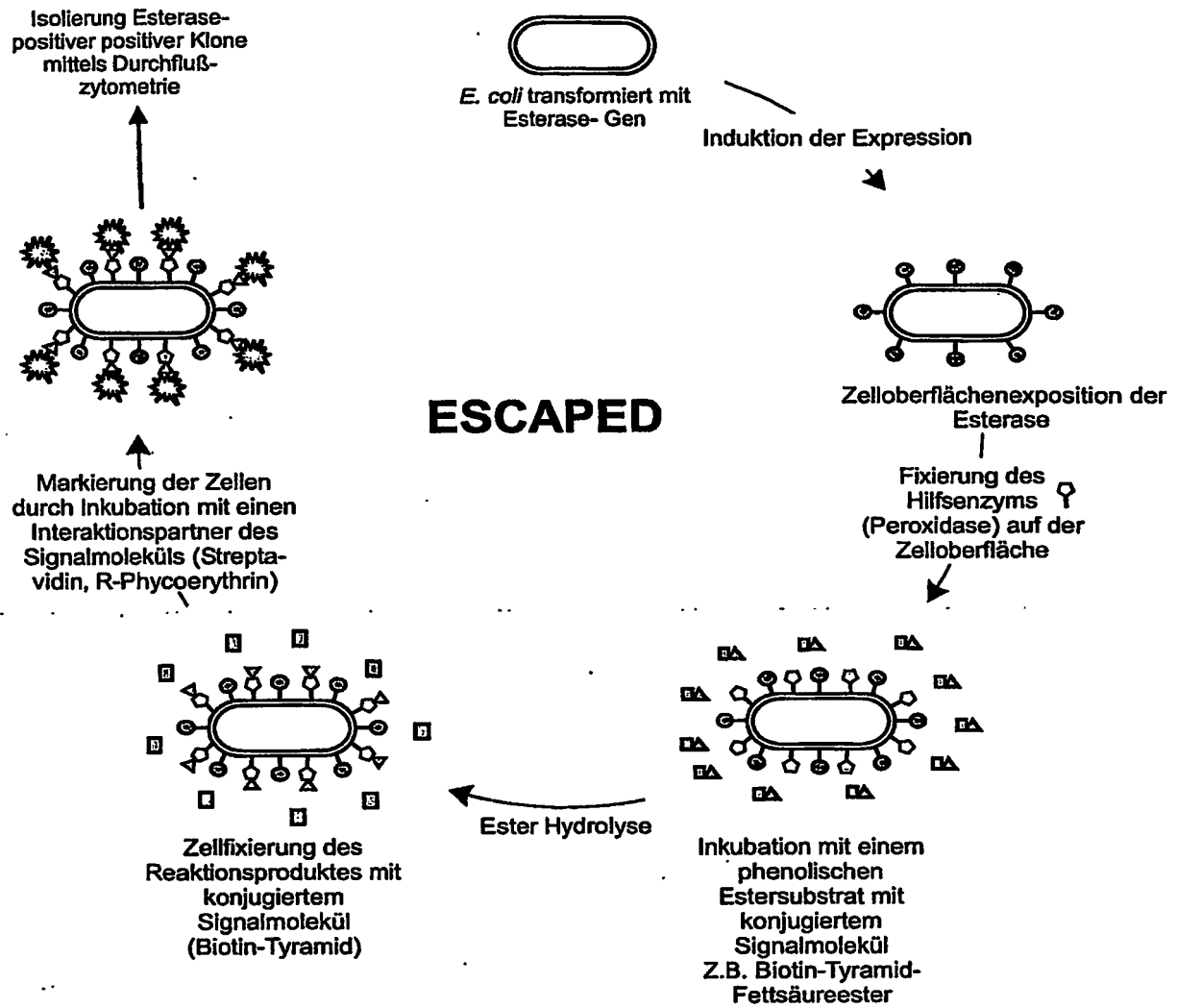
Nach einer jeden Selektionsrunde wurden die sortierten Zellen mit je 2 ml dYT von den Platten abgeerntet und neu angezogen. Dazu wurden jeweils 50 µl geerntete Zellen in 50 ml dYT-Cm²⁵ inokuliert. Nach Induktion der Kultur erfolgte die nächste Markierungs- und Sortierrunde. Auf diese Weise wurden drei Selektionsrunden durchgeführt

Zur Überprüfung der Anreicherungen wurden induzierte Zellen jeder Selektionsrunde auf ihre Esteraseaktivität hin überprüft. Als hydrolysierbares Standardsubstrat diente p-Nitrophenylcaprylat. Während das Ausgangsgemisch keine Esteraseaktivität zeigt, ist nach der ersten Selektionrunde bereits eine leicht erhöhte Substrathydrolyse zu erkennen. Diese ist nach der zweiten Selektionsrunden bereits fast auf dem Niveau einer entsprechenden Probe induzierter pBBX+ Transformanten von E. coli JM109.

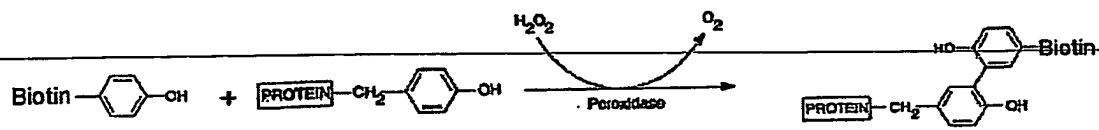
1. Verfahren zur Identifizierung eines Enzyms mit einer gewünschten Substratspaltenden Aktivität, wobei eine Bibliothek, die eine Vielzahl verschiedener Kandidatenpolypeptide kodiert, derart von geeigneten Wirtsorganismen exprimiert wird, dass die Kandidatenpolypeptide auf der Oberfläche der Wirtsorganismen präsentiert werden und die Wirtsorganismen mit dem zu spaltenden Substrat in Kontakt gebracht werden, dadurch gekennzeichnet, dass
 - (a) auf der Oberfläche der Wirtsorganismen ein Hilfsenzym bereitgestellt wird, welches die Ausbildung einer kovalenten Bindung ermöglicht zwischen der Oberfläche der Wirtsorganismen und einem Produkt, das durch die Substratspaltungs-Reaktion entsteht, die durch ein Kandidatenpolypeptid katalysiert wird, und
 - (b) die Wirtsorganismen identifiziert werden, bei denen das Produkt auf der Oberfläche gebunden ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Enzym Hydrolaseaktivität aufweist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Enzym eine Esterase ist.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die Esterase die Esterase EstA aus *Pseudomonas aeruginosa* ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Hilfsenzym eine Peroxidase ist.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Peroxidase eine Meerrettich Peroxidase ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Substrat ein Ester ist.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei der Ester ein Phenolester ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das Substrat mit einem der Marker verbunden ist, der den Nachweis des auf der Zelloberfläche kovalent gebundenen Produktes erlaubt.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei der Marker ein Fluoreszenzmarker, Chemilumineszenzmarker, radioaktiver Marker, Biotin, Avidin, magnetische Partikel oder ein Enzym ist, das zu einem nachweisbaren Farbstoff führt bei Kontakt mit einer chromogenen Substanz.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei der Wirtsorganismus ein Phage ist.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei der Wirtsorganismus eine Zelle ist.
13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei der Wirtsorganismus ein prokaryontischer Organismus ist.
14. Verfahren Ansprüche 13, wobei der prokaryontische Organismus ein gram-negatives Bakterium ist.
15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei das gram-negativen Bakterium von der Art *E. coli* ist.
16. Wirtsorganismus, der ein Kandidatenpolypeptid (Enzym) derart exprimiert, dass es auf der Oberfläche des Wirtsorganismus präsentiert wird, und der gleichzeitig auf seiner Oberfläche ein Hilfsenzym trägt, welches in der Lage ist, eine Reaktion zu katalysieren, die die Ausbildung einer kovalenten Bindung ermöglicht zwischen der Oberfläche des Wirtsorganismus und einem Produkt einer Substratspaltungsreaktion, die von dem Kandidatenpolypeptid katalysiert wird.

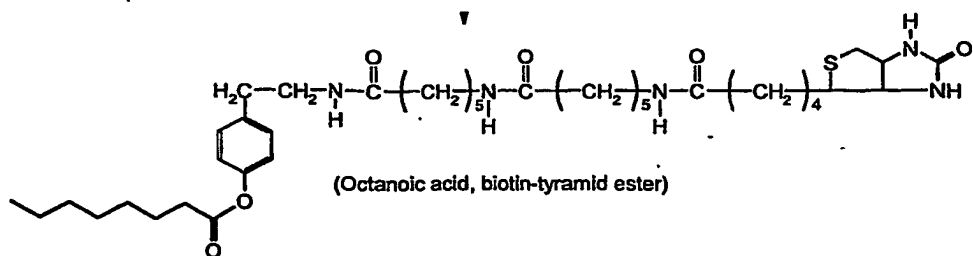
Beschrieben wird ein Verfahren zur Identifizierung von Enzymen mit einer gewünschten Aktivität durch zufallsmäßige Erzeugung einer großen Sammlung von Enzymvarianten, die Synthese dieser Varianten in Wirtsorganismen, deren Präsentation auf der Oberfläche der Organismen und die Isolierung von Enzymvarianten mit den gewünschten Eigenschaften durch den Nachweis der kovalenten Deposition des Reaktionsproduktes auf der Oberfläche des Wirtsorganismus.



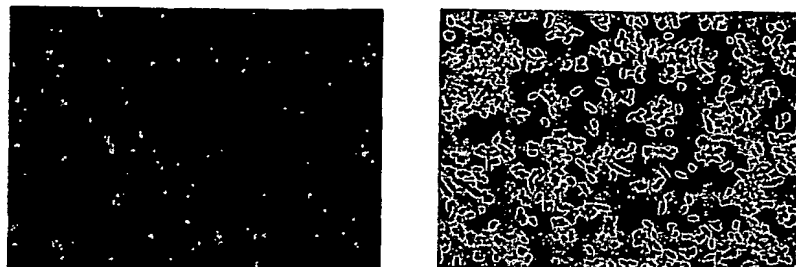
Figur 1



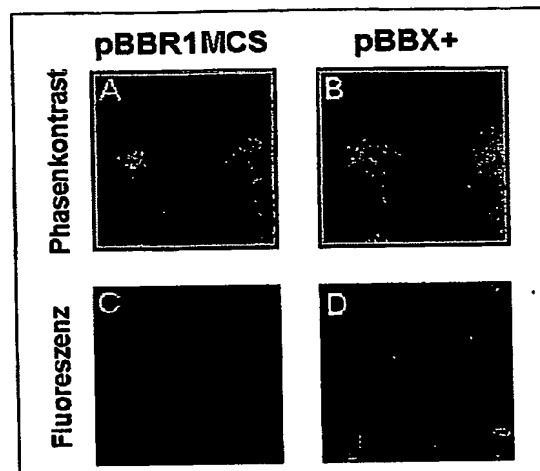
Figur 2: TSA-Reaktion



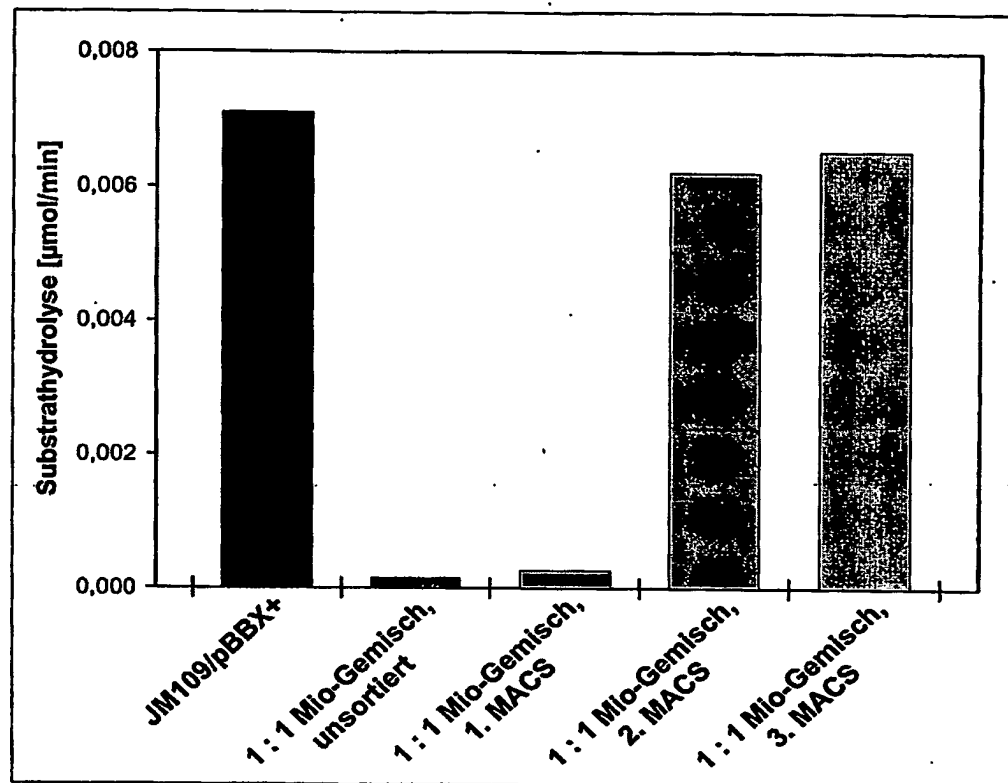
Figur 3: Struktur von Oktansäure Biotin-Tyramidester



Figur 5



Figur 6



Figur 7

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record.

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.